

مقاله ی مروری

مروری بر آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، ساختمان، مهارکننده ها و بیماری های ناشی از نقص در این آنزیم

سارا حسین زاده^۱، محمد مأذنی^{۲*}

۱- دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲ - گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

چکیده

سوکسینات دهیدروژناز که در کمپلکس دوم زنجیره انتقال الکترون و در سیکل کربس وجود دارد یک آنزیم مهم میتوکندریایی می باشد. این آنزیم در چرخه کربس باعث اکسیداسیون سوکسینات به فومارات می شود و توسط ترکیباتی مانند مالونات و اگزالواتات مهار می شود. این آنزیم تنها کمپلکس فسفریلاسیون اکسیداتیو است که زیرواحدهای آن فقط توسط ژنوم هسته کد می شود. مطالعات انجام شده در سال های اخیر که کمپلکس ۲ زنجیره انتقال الکترون دارای نقش های متعددی می باشد به طور مثال: سوکسینات به عنوان سیگنالینگ مولکول مطرح می باشد، در تولید رادیکال های آزاد اکسیژن نقش مهمی دارد که نقص و جهش در این آنزیم باعث بیماری های زیادی در انسان و سایر موجودات می شود از این رو مکانیسم و تنظیم این آنزیم حائز اهمیت می باشد.

این مقاله شامل موضوعاتی مانند ساختمان آنزیم سوکسینات دهیدروژناز، نقش آن در فیزیولوژی سلول ها و بیماری های ناشی از آن می باشد

واژگان کلیدی: سوکسینات دهیدروژناز، بیماری های نقص آنزیمی

مقدمه :

به کوآنزیم Q است. قسمت ناحیه غشایی

آنزیم متشکل از ۲ زیرواحد به نام های سوکسینات دهیدروژناز C(sdhC) و سوکسینات دهیدروژناز D(sdhD) است (۱،۴). همچنین ناحیه غشایی دارای

هم b(Heme b) می باشد که در حد واسط بین سوکسینات دهیدروژناز C و D قرار گرفته است (۱،۴).

دو جایگاه اتصال برای کوآنزیم Q در کمپلکس SDH وجود دارد. یک جایگاه دارای میل اتصال بالا برای

کوآنزیم Q به نام Q_p^1 (Proximal¹)، در سمتی از ماتریکس میتوکندری که نزدیک غشای داخلی است قرار گرفته است. این جایگاه از ریشه های اسید آمینه ایی موجود در زیرواحدهای C، B و D تشکیل شده

است (۱،۴). جایگاه دوم که میل اتصال کمی برای

کوآنزیم Q دارد به نام Q_D^2 (Distal²) موسوم است. این جایگاه به فضای بین غشایی نزدیکتر است (۱،۴). طبق

بررسی های انجام شده توالی های دومین های A و B که خاصیت کاتالیتیک داشته اند در طول تکامل

حفظ شده اند و کمتر دچار تغییر شده اند (۲). به

عبارتی اسیدهای آمینه موجود در زیرواحدهای A و B دارای تشابه ۸۰٪ در گونه های مختلف یوکاریوت ها

هستند (۲). SDH باعث انتقال الکترون از

سوکسینات به FAD شده در نتیجه فومارات و

FADH₂ تولید می شود. به عبارتی الکترون ها از

سوکسینات به FAD رسیده و FADH₂ تولید می

شود. سپس الکترون ها از مراکز آهن - گوگردی گذشته

و باعث احیای کوآنزیم Q به یوبی کینول می

شود (۱،۴،۵). (شکل ۱) کوآنزیم Q یا Q₁₀ نقش آنتی

سوکسینات دهیدروژناز (SDH) در کمپلکس دوم

زنجیره انتقال الکترون و در چرخه ی کربس وجود

دارد این آنزیم در چرخه ی کربس باعث اکسیداسیون

سوکسینات به فومارات شده و در زنجیره ی تنفسی

سبب احیا یوبی کینون به یوبی کینول می شود (۱).

سوکسینات دهیدروژناز یوکاریوتی شامل ۴ زیرواحد

می باشد و تنها آنزیم کمپلکس سیستم فسفریلاسیون

اکسیداتیو است که زیرواحدهای آن فقط توسط ژنوم

هسته کد می شود (۱،۲) و تنها کمپلکس تنفس است

که بعنوان پمپ پروتون از عرض غشای درونی

میتوکندری عمل نمی کند (۱). SDH از نظر

ساختمانی شبیه آنزیم باکتریایی فومارات ردوکتاز

است که واکنش برگشت SDH را در تنفس بیهوازی

کاتالیز می کند (۱). ساختمان SDH دارای یک

ناحیه آبدوست در سمت ماتریکس میتوکندری و یک

ناحیه آبگریز در سمت غشای داخلی است

(۱،۲). ناحیه آبدوست آن از ۲ زیر واحد کاتالیتیک به

نام های سوکسینات دهیدروژناز A(sdhA) و

سوکسینات دهیدروژناز B(sdhB) تشکیل شده

است (۱). زیر واحد های کاتالیتیک A و B دارای

کوفاکتورهای احیا یی هستند که در زنجیره انتقال

الکترون الکترون را به کوآنزیم Q منتقل می

کنند (۱،۳). سوکسینات دهیدروژناز A یک پیوند

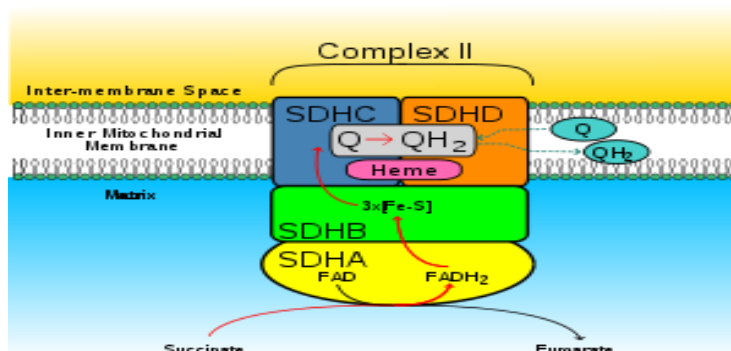
کووالانسی با کوفاکتور FAD دارد و دارای جایگاه ی

برای اتصال به سوکسینات است. سوکسینات

دهیدروژناز B، ۳ مرکز آهن - گوگردی (3Fe-4S،

4Fe-4S، 2Fe-2S) دارد که واسطه انتقال الکترون

اکسیدانی داشته و باعث محافظت از اثرات مخرب رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) می شود (۶).



شکل ۱. کمپلکس ۲ زنجیر تنفسی و مسیر انتقال الکترون از سوکسینات به کوآنزیم Q.

فاکتورهای تجمع سوکسینات دهیدروژناز:

تجمع کمپلکس های زنجیره انتقال الکترون بسیار مهم می باشد و توسط عوامل متعددی صورت می گیرد (۱،۲). این عوامل توسط ژنوم هسته و میتوکندری کد می شوند. گاهی برای تجمع این کمپلکس ها به بیش از ۲۰ پروتئین نیاز است (۱). عواملی موسوم به عوامل تجمع در SDH به نام های SDHF1 و SDHF2 وجود دارند که دارای عملکرد زیر می باشند:

در قرار دادن مراکز آهن - گوگردی در سوکسینات دهیدروژناز B و اتصال FAD در سوکسینات دهیدروژناز A نقش مهمی دارند و جهش و نقص در این فاکتورها باعث بیماری های زیادی می شود (۱،۲،۳).

تنظیمات سوکسینات دهیدروژناز:

فعالیت کاتالیتیکی SDH به وسیله یک سری از تغییرات پس از ترجمه ای تنظیم می شود. بررسی ها نشان می دهد استیلایسیون برگشت پذیر چندین ریشه لیزین در زیر واحد A باعث کاهش فعالیت کاتالیتیکی سوکسینات دهیدروژناز A در موش می شود. فسفریلاسیون سوکسینات

دهیدروژناز A در سایر پستانداران باعث کاهش فعالیت کاتالیتیکی SDH می شود (۱،۵). فعالیت کاتالیتیکی SDH توسط بعضی از واسطه های سیکل کربس نیز تنظیم می شود. به عنوان مثال اگزالواستات به عنوان یک مهارکننده قوی این آنزیم مطرح می باشد (۱،۵).

بیماری های مرتبط با نقص در آنزیم سوکسینات دهیدروژناز:

۱- سندروم لی^۱ (Leigh Syndrome)

سندروم لی به عنوان یک بیماری پیشرونده عصبی مطرح می باشد که بر اثر جهش در سوکسینات دهیدروژناز A دیده می شود. این بیماران دارای علائم نوروپاتولوژی مشخصی می باشند. علائمی از نظیر عدم تعادل، ضعف، تاری دیده می شود. برای این بیماران درمان مشخصی وجود ندارد و معمولاً چند ماه چند ماه پس از تشخیص می میرند (۱،۳،۶).

۲- سندروم خانوادگی پاراگانگلیوم (Familial paraganglioma Syndrome)

۴- سرطان تیروئید

در این افراد جهش در سوکسینات دهیدروژناز B و D دیده میشود (۶).

۵- دیابت

نقص SDH می تواند با دیابت مرتبط باشد حلقه ارتباطی این امر از طریق سیگنالینگ سوکسینات و تولید ROS بیان می شود (۶).

۶- اختلالات دیگر

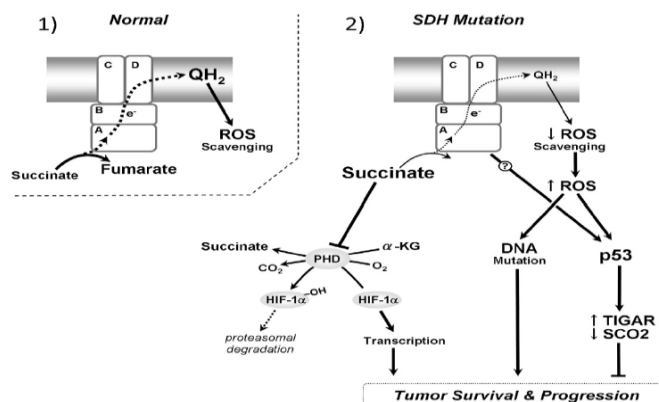
نقص SDH می تواند با اختلالات دیگر نظیر بیماری های نورودژنراتیو و پیری مرتبط باشد (مثل نقش جهش سوکسینات دهیدروژناز A در سندرم داون) (۶).

جهش در زیرواحد های B, C و D باعث این بیماری می شود. این بیماری تومور آندوکراین می باشد که در سلول های عصبی رخ می دهد. از ساختمان مجمله گرفته تا غدد آدرنال را درگیر می کند. در غدد آدرنال باعث تومور سلول های فئوکروموسیتوم می شود. این بیماری سیستم سمپاتیک و پاراسمپاتیک را درگیر می کند. این بیماری معروف به PGLS میباشد که در ۴ گروه تقسیم بندی می شود: PGL1-4. مثلاً در PGL1 جهش در ژن سوکسینات دهیدروژناز C دیده می شود و در PGL4 جهش در ژن سوکسینات دهیدروژناز B دیده می شود (۱, ۳, ۶).

۳- تومور سلول های کلیه

تومور سلول های کلیه به خاطر جهش در ژن سوکسینات دهیدروژناز B ایجاد میشود (۱, ۳).

سوکسینات دهیدروژناز و رادیکال های آزاد اکسیژن



شکل ۲. کمپلکس ۲ و پیامدهای جهش در ژن SDH: (۱) حالت طبیعی زیرواحد های SDH باعث عملکرد معمول آن خواهد شد. (۲) مکانیسم هایی که در جهش زیرواحد های SDH باعث رشد تومور می شوند.

عنوان یک انتی اکسیدان نقش مهمی در پایین نگه داشتن سطح ROS ها دارد. در شرایط نرمال انتقال الکترون از سوکسینات به کوآنزیم Q باعث می شود که یوبی کینول به طور پیوسته تولید شود (۱, ۶). حال اگر این آنزیم دچار جهش گردد انتقال نرمال الکترون به کوآنزیم Q دچار نقص شده و سطح یوبی کینول پایین آمده و باعث افزایش ROS میشود. افزایش ROS باعث جهش در

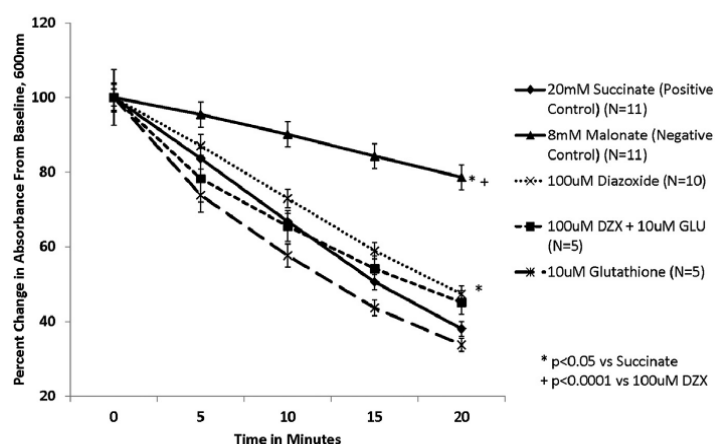
همانطوری که می دانیم رادیکال های آزاد باعث آسیب های زیادی در سلول ها از جمله آسیب به DNA، پروتئین و پراکسیداسیون غشای سلولی می شوند (۵). یکی از واکنش هایی که در بدن باعث تولید ROS می شود زنجیره انتقال الکترون و بخصوص کمپلکس دو این زنجیره می باشد (۵). SDH باعث انتقال الکترون به کوآنزیم Q و سبب تولید یوبی کینول می شود که به

تمام روش های اندازه گیری فعالیت SDH مبتنی بر خاصیت احیا کنندگی این آنزیم می باشد (۸):

(۱) اگر بخواهیم فعالیت آنزیم SDH را اندازه گیری کنیم، میتوانیم از میزان محصول تولید شده یعنی فومارات استفاده کنیم ولی در عمل چنین چیزی امکان پذیر نمی باشد چرا که محصول واکنش یعنی فومارات دارای نیمه عمر پایینی بوده و یا ممکن است از سایر واکنش های متابولیک نیز تولید گردد. بنابراین بهتر است که بر روی واکنش زیر متمرکز شویم:



در این واکنش از ماده ۲،۶-دی کلروفنیل ایندول فنل^۱ (DCIPox) (2,6-dichlorophenylindolphenol) استفاده میشود. این ماده دارای رنگ آبی بوده که حداکثر جذب آن در ۶۰۰ نانومتر میباشد. در حالی که فرم احیا شده ی آن بی رنگ است، بنابراین پیشرفت واکنش می تواند به وسیله تغییر رنگ توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شود. به منظور اطمینان از اینکه منابع دیگری برای احیاء DCIPox وجود نداشته باشد می توان از مالونات به عنوان کنترل منفی استفاده کرد زیرا مالونات مهار کننده رقابتی SDH می باشد و اجازه ی احیاء DCIPox را نمی دهد.



۳) امروزه از کیت هایی تجاری به نام Mito ToxOxphos استفاده می کنند که اساس آن احیای DCIP رنگی به محصولی بدون رنگ می باشد. جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده می شود. فعالیت SDH در این روش در حضور غلظت های افزایشی دی گلیکولیک اسید سنجیده می شود. دی گلیکولیک اسید مهار کننده رقابتی این آنزیم می باشد (۷).

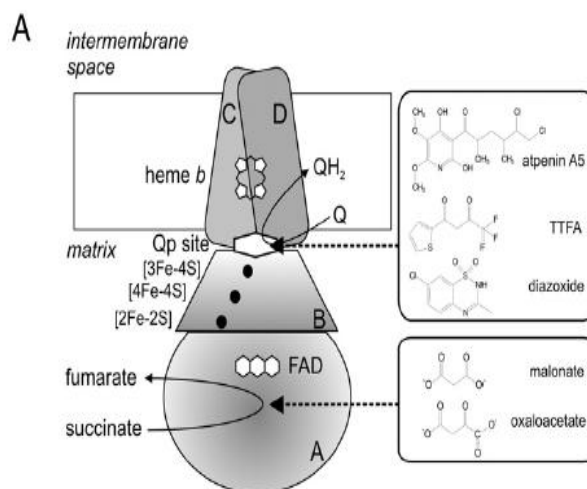
اساس تست MTT

این تست که برای اندازه گیری میزان تکثیر و زنده ماندن سلول ها استفاده می شود اساس آن خاصیت احیاکنندگی آنزیم هایی مانند SDH می باشد (۷، ۸). آزمایش MTT که یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستالهای زرد رنگ تترازولیوم با ف رمول شیمیائی زیر بوسیله آنزیم SDH و تشکیل کریستال های آبی رنگ نامحلول انجام می شود (۸، ۹):

3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

۲) در این روش ابتدا بافت قلب موش را هموژنیزه کرده و با استفاده از سانتریفوژ با دورهای مختلف و با استفاده از بافرهای گوناگون میتوکندری را جدا مینماییم. حال غلظت های یکسانی از میتوکندری تهیه کرده و آن را در معرض سوکسینات به عنوان سوبسترا و مالونات به عنوان مهار کننده قرار میدهیم. این ترکیبات را درون کوت های مخصوص ریخته و روی آن را با پارافیلیم میبندیم. به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته تا واکنش انجام شود سپس فعالیت SDH توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری میشود. جوابها بایستی ظرف مدت ۵ دقیقه قرائت شوند زیرا که با گذشت زمان از میزان جذب سوکسینات کاسته میشود. زمانی که از سوبسترای سوکسینات استفاده شود به خاطر تبدیل سوکسینات به فومارات از طریق SDH از میزان جذب سوکسینات کاسته میشود. ولی زمانی که از مالونات استفاده میشود چون باعث مهار فعالیت SDH نمیشود، غلظت سوکسینات پایین نیامده و جذب آن نیز کاهش نمی یابد. فعالیت SDH به طور معکوس وابسته به میزان جذب سوکسینات میباشد. در نمودار زیر می توان این تغییرات را مشاهده کرد (۸، ۹).

مهارکننده های سوکسینات دهیدروژناز



شکل ۳. مهارکننده های اتصال به جایگاه Q در SDH

مهارکننده های کمپلکس های زنجیره تنفسی به این دلیل مورد بررسی قرار میگیرند که عملکرد و مکانیسم این کمپلکس ها را نشان میدهند (۴، ۵). به طور کلی SDH دارای دو جایگاه می باشد. جایگاهی به نام کربوکسیلات یعنی جایگاهی که سوکسینات به فومارات اکسیده می شود و جایگاه دیگری برای اتصال کوانزیم Q (۵). حال با توجه به این جایگاهها مهارکننده های SDH به ۲ دسته تقسیم می شوند:

(۱) مهار کننده هایی که به جایگاه اتصال سوکسینات به SDH متصل میشوند. این مهار کننده ها دارای شباهت ساختمانی به سوکسینات میباشند. مانند مالونات، اگزالواستات، سم ۳-نیتروپروپیونات.

(۲) مهارکنندههایی که به جایگاه Q متصل میشوند شامل: TTFA (Thenoyltrifluoroacetone)، دیازوکسیدها (Diazoxides)، آلپنین (Alpenin) (شکل ۳) (۵، ۹).

اسید دی گلیکولیک نیز یکی دیگر از مهارکننده های SDH می باشد. که خود یکی از متابولیت های دی اتیلن گلیکول می باشد. اسید دی گلیکولیک یک متابولیت سمی است که باعث نکروز سلول های توبولار کلیوی میشود. ساختمان شیمیایی اسید دی گلیکولیک شبیه به

منابع:

1. Rutter J, Winge DR, Schiffman JD. Succinate dehydrogenase - Assembly, regulation and role in human disease. Mitochondrion. 2010 Jun; 10(4):393-401.
2. Huang S, Millar AH. Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. Curr Opin Plant Biol. 2013 Jun; 16(3):344-9.
3. Hoekstra AS, Bayley JP. The role of complex II in disease. Biochim Biophys Acta. 2013; 1827(5):543-551.
4. Iverson TM. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: a structural perspective. Biochim Biophys Acta. 2013 May; 1827(5):648-57.

ساختمان حد واسط های سیکل کربس می باشد. مطالعات نشان داده اند که اسید دی گلیکولیک دارای ساختمانی شبیه به سوکسینات بوده و مهارکننده رقابتی این آنزیم می باشد (۷). کربوکسین نیز مانند مالونات از مهار کننده های رقابتی آنزیم SDH می باشد (۷). پراکسید هیدروژناز ترکیباتی می باشد که در میتوکندری تولید می شود و از مهار کننده های آنزیم SDH می باشد (۱۰). بیشتر مهارکننده های آنزیم SDH مانند مالونات و اسید دی گلیکولیک مهارکننده های رقابتی این آنزیم بوده و باعث افزایش k_m ظاهری آنزیم شده و تاثیری بر روی V_{max} آنزیم ندارد (۵).

نتیجه گیری:

شواهد زیادی وجود دارد که نقش تنظیم کنندگی آنزیم SDH بر میزان تولید ROS را نشان می دهد.

جهش در این آنزیم باعث بروز بیماری های مختلفی می شود که اکثرا کشنده می باشند.

مکانسم تولید ROS توسط کمپلکس ۲ و بیماریزایی ناشی از آن باید توسط مدل های متفاوتی مانند باکتری ها مورد بررسی قرار گرفته و از آنالیز نتایج آن برای بیماری های انسانی استفاده کرد.

5. Dröse S. Differentialeffects of complexII on mitochondrialROSproduction and their relation to cardio protective pre- and postconditioning. *BiochimBiophysActa*. 2013 May; 1827(5):578-87.
6. Wojtovich AP, Smith CO, Haynes CM, Nehrke KW, Brookes PS. Physiologicalconsequences of complexIIinhibition for aging, disease and the mK_{ATP}channel. *BiochimBiophysActa*. 2013 May; 1827(5):598-611.
7. Landry GM, Dunning CL, Conrad T, Hitt MJ, McMartin KE. Diglycolicacidinhibitssuccinate dehydrogenaseactivity in humanproximaltubulecellsleading to mitochondrial dysfunction and celldeath. *ToxicolLett*. 2013 Jul 1; [Epub ahead of print].
8. Puntel RL, Roos DH, Seeger RL, Rocha JB. Mitochondrialelectron transferchaincomplexesinhibition by different organochalcogens. *ToxicolIn Vitro*. 2013 Feb; 27(1):59-70.
9. Anastacio MM, Kanter EM, Makepeace C, Keith AD, Zhang H, Schuessler RB, Nichols CG, Lawton JS. Cardioprotectivemechanism of diazoxide involves the inhibition of succinate dehydrogenase. *Ann Thorac Surg*. 2013 Jun; 95(6):2042-50.
10. Moser MD, Matsuzaki S, Humphries KM. Inhibition of succinate-linked respiration and complex II activity by hydrogen peroxide. *ArchBiochemBiophys*. 2009 Aug 1; 488(1):69-75.